

(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES
PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum
22. Mai 2003 (22.05.2003)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer
WO 03/042231 A2

(51) Internationale Patentklassifikation⁷: C07K

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP02/12545

(22) Internationales Anmeldedatum:
9. November 2002 (09.11.2002)

(25) Einreichungssprache: Deutsch

(26) Veröffentlichungssprache: Deutsch

(30) Angaben zur Priorität:
101 56 482.1 12. November 2001 (12.11.2001) DE

(71) Anmelder und

(72) Erfinder: JUNG, Gundram [DE/DE]; Schwabstrasse 30,
72108 Rottenburg-Wendelsheim (DE).

(71) Anmelder und

(72) Erfinder (nur für US): JUNG, Gudram [DE/DE];
Schwabstrasse 30, 72108 Rottenburg-Wendelsheim (DE).

(74) Anwälte: OTTEN, H. usw.; Witte, Weller & Partner,
Patentanwälte, Postfach 105462, 70047 Stuttgart (DE).

(81) Bestimmungsstaaten (national): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(84) Bestimmungsstaaten (regional): ARIPO-Patent (GI, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches Patent (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, SK, TR), OAPI-Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Veröffentlicht:

— ohne internationalen Recherchenbericht und erneut zu veröffentlichen nach Erhalt des Berichts

Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes und der anderen Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe der PCT-Gazette verwiesen.

(54) Title: BISPECIFIC ANTIBODY MOLECULE

(54) Bezeichnung: BISPEZIFISCHES ANTIKÖRPER-MOLEKÜL

(57) **Abstract:** A first bispecific antibody molecule comprises at least one binding site with a variable domain on a light chain (V_L) and a variable domain for the T-cell receptor CD-28, linked thereto on a heavy chain (V_H). The antibody molecule further comprises at least one binding site with a variable domain on a heavy chain (V_H) and a variable domain for a tumour antigen, linked thereto on a light chain (V_L). The variable domains on the heavy chains for both specificities are connected to each other by means of a peptide linker. A second bispecific antibody molecule is bivalent for CD-28 and at least monovalent for the tumour antigen.

(57) **Zusammenfassung:** Ein erstes bispezifisches Antikörper-Molekül weist zumindest eine Bindestelle mit einer variablen Domäne einer leichten Kette (V_L) und eine damit verbundene variable Domäne einer schweren Kette (V_H) für den T-Zell-Rezeptor CD28 auf. Das Antikörper-Molekül weist ausserdem zumindest eine Bindestelle mit einer variablen Domäne einer schweren Kette (V_H) und eine damit verbundene variable Domäne einer leichten Kette (V_L) für ein Tumor-Antigen auf. Die variablen Domänen der schweren Ketten der beiden Spezifitäten sind miteinander durch einen Peptidlinker verbunden. Ein zweites bispezifisches Antikörper-Molekül ist bivalent für CD28 und zumindest monovalent für das Tumor-Antigen.

WO 03/042231 A2

Bispezifisches Antikörper-Molekül

Die vorliegende Erfindung betrifft ein bispezifisches Antikörper-Molekül, ein bispezifisches Antikörper-Molekül mit Bivalenz für CD28, für das Antikörper-Molekül kodierende Nukleinsäuren, das Antikörper-Molekül und/oder die für das Antikörper-Molekül kodierende Nukleinsäure enthaltende Zellen und die Verwendung des bispezifischen Antikörper-Moleküls.

Natürliche Antikörper sind im einfachsten Fall Y-förmige, tetramere Glykoproteine. Ihre typische Struktur besteht aus zwei identischen leichten Ketten und zwei identischen schweren Ketten. Die leichte Kette setzt sich aus den zwei Domänen V_L

und C_L zusammen, die schwere Kette dagegen aus den vier Domänen V_H , C_H1 , C_H2 und C_H3 . Dabei kennzeichnen die Buchstaben C und V jeweils die konstanten und die variablen Teile des Antikörpers. Disulfid-Brücken verbinden die beiden schweren Ketten untereinander, außerdem die schweren mit den leichten Ketten.

Als "rekombinante Antikörper" werden im allgemeinen Antigen-bindende Fragmente eines Antikörpers bezeichnet, welcher von einer heterologen Quelle produziert wird. Die kleinste Antikörper-Einheit, die noch ein Antigen binden kann, sind F_v -Fragmente, welche die variable Domäne der schweren und der leichten Kette enthalten.

In Forschung und Therapie werden häufig die sogenannten single-chain F_v -Fragmente (scF_v) verwendet. In diesen scF_v -Fragmenten ist die variable Domäne der schweren Kette mit der variablen Domäne der leichten Kette durch einen kurzen Peptidspacer kovalent verbunden. Dieser Spacer wird auf der genetischen Ebene eingeführt. Die scF_v -Fragmente können durch das Hinzufügen kurzer Markierungssequenzen entweder am N-Terminus oder am C-Terminus gereinigt und detektiert werden.

Unter den rekombinanten Antikörpern spielen die bispezifischen Antikörper eine große Rolle, bei denen Antigen-Bindestellen gegen zwei unterschiedliche Antigene miteinander verbunden sind. Verschiedene Strategien stehen zur Verfügung, um bispezifische rekombinante Antikörperfragmente herzustellen. So können bspw. zwei unterschiedliche scF_v -Fragmente durch die Einführung eines zusätzlichen Linkers zwischen dem C-Terminus des ersten scF_v -Fragments und dem N-Terminus des zweiten scF_v -Fragments verbunden werden. Bei der Verwendung zweier identischer scF_v -

Fragmente erhält man Antikörper, die in bezug auf eine Bindestelle bivalent sind, bei Verwendung zweier unterschiedlicher scF_v-Fragmente generiert man Fragmente, die in bezug auf eine Bindestelle monovalent sind, gleichzeitig aber bispezifisch, da sie zwei unterschiedliche Bindestellen aufweisen.

Um sogenannte Diabodies herzustellen, wird ein sehr kurzer Linker zwischen der variablen Domäne der schweren Kette und der variablen Domäne der leichten Kette gewählt, um so das Verbinden der V_H- und V_L-Domänen einer Kette zu verhindern. Dadurch können dimere Moleküle gebildet werden, bei denen die V_H- und V_L-Domänen zweier unterschiedlicher Ketten ein doppelköpfiges Molekül bilden. Bei der Verwendung von zwei unterschiedlichen, nicht gekoppelten Antikörperspezifitäten (bspw. A und B), die in der Reihenfolge V_{HA}-V_{LB} und V_{HB}-V_{LA} in der gleichen Zelle exprimiert werden, kann man bispezifische Diabodies bilden. Diese dimeren Diabody-Moleküle können auch durch ein monomeres Molekül hergestellt werden, wenn man die zwei V_H-V_L-Fragmente mit einem zusätzlichen Peptidlinker covalent verbindet (single-chain Diabody, scDb). Solche dimeren bispezifischen Antikörper besitzen also zwei Valenzen für jede Spezifität.

Bispezifische Diabodies oder Antikörper wurden vor allem deswegen generiert, um sowohl die Valenz als auch die Stabilität und damit das therapeutische Potential zu steigern. Bisher konnte gezeigt werden, daß durch single-chain Diabodies vor allem die Bindungsstärke verbessert werden konnte.

Tomlinson und Holliger, "Methods for Generating Multivalent and Bispecific Antibody Fragments", Methods in Enzymology (2000) 326:461-479, beschreiben die Herstellung von bispezifischen Di-

abodies. Solche bispezifischen Diabodies erwiesen sich als effektiv in der Rekrutierung der cytotoxischen T-Zellen, des Komplements und der Antikörper-abhängigen Effekter-Funktionen, wie bspw. Zell-vermittelte Cytotoxizität und Phagocytose.

Kipriyanov et al., "Bispecific Tandem Diabody for Tumor Therapy with improved Antigen Binding and Pharmacokinetics" J. Mol. Biol. (1999) 293:41-56, beschreiben eine Diabody-Bildung eines single-chain-Moleküles mit vier V-Regionen zweier unterschiedlicher Spezifitäten. Gleichzeitig beschreibt die Arbeitsgruppe eine Dimerbildung dieses single-chain Antikörpers bzw. einen bispezifischen Tandemdiabody. Die Tandemdiabodies sind also bivalent für jede Spezifität, in der vorliegenden Veröffentlichung für CD19 und CD3. Die Tandem-Diabodies zeigten zwar eine gesteigerte Affinität zu ihrem Antigen, eine damit verbundene gesteigerte biologische Aktivität konnte aber nicht nachgewiesen werden. So besaßen diese Tandem-Diabodies eine nur gering erhöhte Aktivität bezüglich der Abtötung von Tumorzellen im Vergleich zu den single-chain-Diabodies.

Damit naive T-Zellen an einer anpassungsfähigen Immunantwort teilnehmen können, müssen sie zur Proliferation und Differenzierung aktiviert werden. Diese Aktivierung von naiven T-Zellen erfolgt durch die Erkennung eines fremden Peptidfragments mit dem Antigen-spezifischen T-Zell Rezeptor CD3-Komplex. Generell ist anerkannt, daß die effektive Aktivierung von naiven T-Zellen zur Proliferation und Differenzierung ein zweites oder costimulierendes Signal zusätzlich zu dem Antigen-spezifischen Stimulus über den TCR/CD3-Komplex benötigt. Die am besten charakterisierten costimulatorischen Moleküle auf Antigen-präsentierenden Zellen sind die Glykoproteine B7.1 und B7.2.

Der Rezeptor für B7-Moleküle auf T-Zellen ist CD28, und die Ligation von CD28 durch B7 Moleküle (oder durch anti-CD28 Antikörper) costimuliert das Wachstum von naiven T-Zellen. Nach der Aktivierung der T-Zellen wird auch die Expression von CD28 gesteigert.

Zwischenzeitlich konnten noch weitere costimulierende Rezeptoren identifiziert werden, dennoch ist bisher die B7/CD28 Interaktion der weitaus stärkste Costimulus für naive T-Zellen.

Auf naiven, ruhenden T-Zellen ist CD28 der einzige Rezeptor für B7 Moleküle. Sobald aber die Zellen aktiviert werden, exprimieren sie den zusätzlichen Rezeptor CTLA-4. CTLA-4 bindet B7-Moleküle weitaus stärker als CD28 und liefert negative Signale an die aktivierte T-Zelle, wodurch u.a. weniger Interleukin-2 gebildet wird. Deshalb erwies sich ein therapeutischer Einsatz von B7-Proteinen als costimulierende Moleküle als zweifelhaft, da der auf durch B7 aktivierte T-Zellen exprimierte CTLA-4-Rezeptor die T-Zell-Aktivierung unterdrückt.

Eine Stimulierung des TCR/CD3-Komplexes mit bispezifischen Antikörpern induzierte bei systemischen *in vivo*-Anwendungen beim Menschen schwerwiegende und unerwartete Nebenwirkungen (Tibben et al.: "Pharmacogenetics, biodistribution and biological effects of intravenously administered bispecific monoclonal antibody OC/TR Fab₂ in ovarian carcinoma patients", (1996) Int. J. Cancer 66:447-483).

Vor einigen Jahren wurde in verschiedenen Veröffentlichungen gezeigt, daß chemisch hybridisierte bispezifische Antikörper gerichtet gegen Tumor-assoziierte Antigene und gegen CD28 eine

T-Zell-Costimulierung gerichtet gegen Tumorzellen *in vitro* und *in vivo* induzieren: siehe z.B. Jung, G. und Müller-Eberhard, H.J.: "An *in vitro* model for tumor immunotherapy with antibody heteroconjugates" *Immunology Today* (1988) 9:257-260; Große-Hovest, L. et al.: "Tumor growth inhibition with bispecific antibody fragments in a syngeneic mouse melanoma model: The role of targeted T cell costimulation via CD28" *Int. J. Cancer* (1999) 80:138-144.

In den Experimenten wurden diese bispezifischen Antikörper in Kombination mit bispezifischen Antikörpern, die den TCR/CD3-Komplex stimulieren, verwendet. Alleine verwendet, waren sie nur gering effektiv.

1996 konnten Hayden et al., "Costimulation by CD28sFv expressed on the tumor cell surface or as a soluble bispecific molecule targeted to the L6 carcinoma antigen" *Tissue Antigen* (1996) 48:242-254, zeigen, daß transfizierte CD28 single-chain Antikörper und ein rekombinanter bispezifischer Antikörper mit Tumor/CD28-Spezifität ähnliche costimulatorische Effekte in T-Zell-Blasten hervorrufen konnten, wobei die Blasten durch Phythämagglutinin bereits zur Proliferation stimuliert waren. Das beschriebene single-chain scFv-Molekül ist jedoch nicht supra-agonistisch.

Vor diesem Hintergrund liegt der vorliegenden Anmeldung die Aufgabe zugrunde, ein Reagenz bereitzustellen, das T-Zellen supra-agonistisch, also ohne ein zusätzliches costimulierendes Signal effektiv stimulieren kann.

Diese Aufgabe wird erfindungsgemäß gelöst durch ein erstes bispezifisches Antikörper-Molekül mit einer eine variable Domäne einer leichten Kette (V_L) und eine damit verbundene variable Domäne einer schweren Kette (V_H) aufweisenden Bindestelle für den T-Zell-Rezeptor CD28 und mit einer eine variable Domäne einer schweren Kette (V_H) und eine damit verbundene variable Domäne einer leichten Kette (V_L) aufweisenden Bindestelle für ein Tumor-Antigen, wobei die variablen Domänen der schweren Ketten miteinander durch einen Peptidlinker verbunden sind.

Die Aufgabe wird auch gelöst durch ein zweites bispezifisches Antikörper-Molekül mit Spezifität für den T-Zell-Rezeptor CD28 und Spezifität für ein Tumor-Antigen, wobei das bispezifische Antikörper-Molekül bivalent für CD28 ist.

Insgesamt ist bevorzugt, wenn die Bindestelle für den T-Zell-Rezeptor CD28 an den humanen T-Zell-Rezeptor CD28 bindet. dessen Sequenz ist bspw. veröffentlicht in Aruffo A. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 84:8573-8577 (1987).

Die Aufgabe wird außerdem durch ein Verfahren zur Behandlung von Zellen gelöst, bei dem das erfindungsgemäße erste oder zweite bispezifische Antikörper-Molekül eingesetzt wird, um eine supra-agonistische tumorzellinduzierte Aktivierung von T-Zellen zu bewirken, so daß keine zusätzlichen exogenen Stimuli benötigt werden.

Die der Erfindung zugrunde liegende Aufgabe wird auf diese Weise vollkommen gelöst.

Die Erfinder der vorliegenden Anmeldung konnten nämlich zeigen, daß es möglich ist, durch alleinige Aktivierung des costimulatorischen Rezeptors CD28 mittels eines erfindungsgemäßen bispezifischen Antikörpermoleküls oder mittels eines Dimers des ersten erfindungsgemäßen bispezifischen Antikörper-Moleküls T-Zellen effektiv zu stimulieren, ohne daß ein weiterer Antigen-spezifischer Stimulus über den TCR/CD3-Komplex notwendig ist. Das bedeutet also z.B., daß dieser Prozeß in gerichteter Weise auf der Oberfläche von Tumorzellen erfolgt.

Gleichzeitig wird vermieden, daß es zur Stimulation von CTLA-4-Molekülen auf den aktivierten T-Zellen kommt. Durch Vermeidung der Stimulation dieser supprimierenden Moleküle wird die Proliferation der T-Zellen nicht begrenzt, wodurch eine angemessene Immunantwort nicht unterdrückt wird.

Mit anderen Worten, die T-Zellen werden aktiviert, wenn das bispezifische Antikörper-Molekül das CD28-Molekül auf den T-Zellen bivalent bindet und gleichzeitig mit seiner anderen Bindungsstelle an das Tumor-Antigen auf einer Tumorzelle bindet. Es handelt sich dabei sozusagen um eine tumorzellinduzierte, supra-agonistische Aktivierung von T-Zellen, bei der das erfindungsgemäße bispezifische Antikörper-Molekül dazu in der Lage ist, die T-Zellen ohne zusätzliches Signal effektiv zu stimulieren, wenn es neben dem CD 28-Molekül auch an das Tumor-Antigen gebunden hat. Es handelt sich damit um eine selektive, tumorzellinduzierte Aktivierung von T-Zellen, bei der keine Bindung an den TCR/CD3-Komplex erforderlich ist.

Die Erfinder der vorliegenden Anmeldung haben in verschiedenen eigenen Versuchen weiterhin gezeigt, daß die bispezifischen An-

antikörper-Moleküle in Bezug auf die Abtötung von Tumorzellen ausgesprochen effektiv waren.

Die Erfinder haben gefunden, daß das erste Antikörper-Molekül bei rekombinanter Herstellung dazu neigt, spontan Dimere zu bilden, und daß die Dimere wegen ihrer Bivalenz für CD28 besonders effizient T-Zellen stimulieren. Die Dimere können dabei auch gezielt erzeugt werden. Da die Bivalenz für CD28 die supraagonistischen Eigenschaften des neuen Antikörper-Moleküls bewirken, zeigt auch das zweite Antikörper-Molekül diese supraagonistische Wirkung, denn es ist ebenfalls bivalent für CD28, während es für das Tumor-Antigen mono- oder bivalent sein kann.

In einem Ausführungsbeispiel ist das erste bispezifische Antikörper-Molekül daher mit einem weiteren ersten bispezifischen Antikörper-Molekül zu einem Dimer verbunden.

Anhand von eigenen Versuchen haben die Erfinder gezeigt, daß erfindungsgemäße erste bispezifische Antikörper-Moleküle überraschenderweise dimerisieren. Eine Dimerisierung derartig konstruierter Antikörper-Moleküle war bisher nicht beschrieben und deswegen auch völlig unerwartet.

Durch die Dimerisierung weist das bispezifische Antikörper-Molekül zwei Bindestellen für CD28 und zwei Bindestellen für das Tumor-Antigen auf. Die Erfinder konnten mit einem derartigen Antikörper-Molekül eine effektive tumorzellinduzierte Aktivierung von T-Zellen zeigen, was zu einer effizienten Abtötung von Tumor-Zellen führte, die das Tumor-Antigen exprimierten.

In einer weiteren Ausführungsform des ersten Antikörper-Moleküls kann weiterhin an eine der leichten Ketten zumindest ein Teil eines *fos-jun*-Adaptors oder einer Hinge-Region fusioniert sein.

Durch Anfusionieren eines *fos-jun*-Adaptors kann eine Dimerisierung gezielt herbeigeführt werden, da die Genprodukte des *fos-jun*-Adaptors spontan assoziieren.

Unter einer Hinge-Region wird der Abschnitt der schweren Kette eines Immunglobulins verstanden, der zwischen der ersten und zweiten konstanten Domäne liegt. Auch diese Maßnahme führt zu einer gezielten Dimerbildung.

Eine Verwendung dieser funktionellen Einheiten und Beispiele für deren Sequenzen sind z.B. zusammengefaßt von van Spriël et al.: "Immunotherapeutic Perspective for Bispecific Antibodies" *Immunol. Today* (2000) 21(8):391-397.

Allgemein ist bevorzugt, wenn das Tumor-Antigen ausgewählt ist aus der Gruppe umfassend Melanom-assoziiertes Proteoglykan, HER-2/neu oder CD20.

HER-2/neu ist ein Oncogen und spielt v.a. bei Brustkrebs eine große Rolle. CD20 ist ein Antigen, das insbesondere auf Tumorzellen vom B-Zell-Typ gefunden wird.

Die Aufzählung dieser Tumor-Antigene ist lediglich beispielhaft, die Erfindung bezieht auch andere Zelloberflächenmoleküle mit ein, die Tumor-assoziiert sind.

Weiterhin ist bevorzugt, wenn der Peptidlinker bei dem ersten Antikörper-Molekül zumindest einen Teil des N-Terminus der C_H1 Domäne des menschlichen IgG aufweist.

Dabei ist insbesondere bevorzugt, wenn der Teil des N-Terminus der C_H1 Domäne des menschlichen IgGs die Aminosäuresequenz Ala-Ser-Thr-Lys-Gly-Pro-Ser-Val-Phe-Pro-Leu-Ala-Pro-Ser-Ser-Ser-Gly-Ser-Gly enthält.

In einer Ausführungsform des zweiten Antikörper-Moleküls ist an die beiden konstanten Domänen eines Fab-Fragments mit Anti-Tumor-Spezifität jeweils ein scFv-Fragment mit CD28-Spezifität fusioniert.

Durch diese Konstruktion wird ein Antikörper-Molekül geschaffen, das für CD28 bivalent und für das Tumor-Antigen monovalent ist.

Eine Konstruktion dieses Typs aber mit anderen Spezifitäten wird bspw. beschrieben von Schoonjans, R. et al.: "Fab Chains as an Efficient Heterodimerization Scaffold for the Production of Recombinant Bispecific and Tri-specific Antibody Derivatives", J. Immunol. (2000) 165(12):7050-7057.

In einer weiteren Ausführungsform ist das zweite bispezifische Antikörper-Molekül auch für das Tumor-Antigen bivalent.

Das erfindungsgemäße bispezifische Antikörper-Molekül ist bivalent für CD28 und mono- oder bivalent für das Tumor-Antigen, wobei durch die Bivalenz für CD28 die erwähnte supra-agonistische Wirkung erzielt wird, wodurch die T-Zellen ohne

zusätzliches Signal stimuliert werden, aber nur dann, wenn neben der bivalenten Bindung an das CD28-Molekül auf der T-Zelle auch eine mono- oder bivalente Bindung an das Tumor-Antigen auf der Tumorzelle erfolgt ist.

In einer weiteren Ausführungsform des zweiten Antikörper-Moleküls ist an die schweren Ketten eines kompletten Antikörpers mit Anti-Tumor-Spezifität jeweils ein ScFv-Fragment mit CD28-Spezifität fusioniert.

Unter einem "kompletten" Antikörper wird dabei ein Antikörper verstanden, der die Struktur eines Immunglobulins besitzt. Diese enthalten zwei schwere Ketten mit jeweils einer variablen und drei konstanten Domänen und zwei leichte Ketten mit jeweils einer variablen und einer konstanten Domäne.

Durch die Fusionierung jeweils eines scFv-Fragments mit CD28-Spezifität an ein solches komplettes Antikörper-Molekül mit Anti-Tumor-Spezifität wird ein bispezifisches Antikörper-Molekül geschaffen, das sowohl für CD28 als auch für ein Tumor-Antigen bivalent ist.

Eine Konstruktion dieses Typs aber mit anderen Spezifitäten und deren Funktionalität ist bspw. beschrieben in van Spriel et al.: "Immunotherapeutic Perspective for Bispecific Antibodies", Immunol. Today (2000) 21(8):391-397.

Die Erfindung betrifft außerdem eine Nukleinsäure, kodierend für ein erfindungsgemäßes, bispezifisches Antikörper-Molekül. Die Nukleinsäure ist im allgemeinen eine DNA oder eine RNA, vorzugsweise doppelsträngige DNA.

Gegenstand der Erfindung ist weiterhin ein Vektor, der die erfindungsgemäße Nukleinsäure umfaßt. Der Vektor kann hierbei ein viraler oder ein nicht-viraler Vektor sein.

In einer Ausführungsform der Erfindung wird die Nukleinsäure oder der Vektor in einer Zelle exprimiert. Die Zelle kann dabei aus der Gruppe umfassend Säuger-, Bakterien-, Insekten, Pflanzen- oder Hefezellen umfassen. Die mit der erfindungsgemäßen Nukleinsäure oder dem erfindungsbemäßen Vektor transformierte oder transfizierte Zelle wird kultiviert und das exprimierte Genprodukt anschließend isoliert.

Ein weiterer Gegenstand der Erfindung ist eine pharmazeutische Zusammensetzung mit einem erfindungsgemäßen bispezifischen Antikörper-Molekül und einem pharmazeutisch akzeptierbaren Träger.

Das erfindungsgemäße bispezifische Antikörper-Molekül kann dabei zur tumorzellinduzierten T-Zell-Aktivierung verwendet werden, insbesondere bei der Therapie und/oder Prophylaxe von Tumorerkrankungen, um solche Tumorzellen selektiv über die Aktivierung der T-Zellen abzutöten, die das Tumor-Antigen exprimieren. Eine selektive Abtötung von Tumorzellen kann bspw. *in vitro* dadurch erfolgen, daß T-Zellen und das Tumor-Antigen exprimierende Tumorzellen zusammen mit der erfindungsgemäßen bispezifischen Antikörper-Molekül inkubiert werden. *In vivo* kann ein selektives Abtöten von Tumorzellen durch die Verabreichung eines Medikamentes erfolgen, das das bispezifische Antikörper-Molekül enthält. Dieses Molekül bindet sich dann einerseits mit seiner Bindungsstelle für das Tumor-Antigen an die so definierte Tumorzelle und andererseits an im Körper vorhandene

T-Zellen, und zwar über die bivalente Bindungsstelle für das CD28-Molekül, das auf den T-Zellen exprimiert ist. Da eine weitere Stimulierung der T-Zellen über den TCR/CD3-Komplex nicht erforderlich ist, kommt es auf diese supra-agonistische Weise zu einer tumorzellinduzierten Aktivierung der T-Zellen und damit zu einem selektiven Abtöten der Tumorzellen.

Bei menschlichen T-Zellen konnte zwar eine TCR/CD3-unabhängige Aktivierung bei Verwendung eines besonders immobilisierten CD28-Antikörpers (BW828) beobachtet werden, diese erwies sich jedoch als nur gemäßigt, und der auch in Ausführungsbeispielen der vorliegenden Anmeldung verwendete 9.3 (CD28)-Antikörper zeigte sich als nur äußerst gering effektiv in der Aktivierung von T-Zellen: siehe Siefken et al.: "A CD28 associated signaling pathway leading to cytokine gene transcription and T cell proliferation without TCR engagement" J. Immunol. (1998) 161:1645-1651 und in den Verweisen dort. Dies bestätigt, daß der Antikörper erst in bispezifischer Form, d.h. nach Bindung an das Ziel-Antigen supra-agonistisch wird. In diesem Sinn ist die supra-agonistische Wirkung selektiv.

Bischof et al., "Autonomous induction of proliferation, JNK and NFalphaB activation in primary resting T cells by mobilized CD28" Eur. J. Immunol. (2000) 30(3):876-882, konnten zwar zeigen, daß Antikörper gegen CD28 von Ratten eine T-Zell Proliferation ohne zusätzliches TCR/CD3 stimulierten, jedoch wurde dieser Effekt den besonderen CD28 Antikörpern, spezifisch für immobilisiertes CD28 zur Abkürzung der TCR/CD3-unabhängigen CD28-Rekrutierung, zugeschrieben. Im übrigen beschreiben diese Arbeiten mit monospezifischen CD28-Antikörpern zwar supra-

agonistische Wirkungen, aber nicht solche, die selektiv durch Bindung an ein Ziel-Antigen ausgelöst werden.

Weitere Vorteile ergeben sich aus der Beschreibung und der beigefügten Zeichnung.

Es versteht sich, daß die vorstehend genannten und die nachstehend noch zu erläuternden Merkmale nicht nur in der jeweils angegebenen Kombination, sondern auch in anderen Kombinationen oder in Alleinstellung verwendbar sind, ohne den Rahmen der vorliegenden Erfindung zu verlassen.

Ausführungsbeispiele der Erfindung sind in der Zeichnung dargestellt und werden in der nachfolgenden Beschreibung näher erläutert. Es zeigen:

Fig. 1a eine schematische Darstellung des ersten Antikörper-Moleküls auf genetischer Ebene;

Fig. 1b die Aminosäuresequenz eines erfindungsgemäßen ersten bispezifischen Antikörper-Moleküls;

Fig. 2a die Reinigung des rekombinanten Antikörpers durch Gelfiltration;

Fig. 2b die Fraktionen aus der Gelfiltration, aufgetrennt durch SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese;

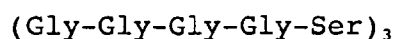
Fig. 3 die Bindungsaktivität des monomeren und dimeren rekombinanten single-chain-Antikörpers mit CD28/9.2.27-Spezifität an Jurkat-T-Zell Lymphomzellen;

- Fig. 4 die Aktivierung von peripheren Blut-mononuklearen Zellen (PBMC) durch bestrahlte SKMel63-Zellen, die für drei Tage mit dem rekombinanten Antikörperdimer oder dem rekombinanten Antikörpermonomer inkubiert wurden;
- Fig. 5 das Abtöten von SKMel63-Zellen nach einer Inkubation von vier Tagen mit peripheren Blut-mononuklearen Zellen (PBMC) und dem rekombinanten Antikörper als Monomer und als Dimer;
- Fig. 6 die Lyse der SKMel63- und M21-Melanom-Zellen durch periphere Blut-mononukleare Zellen (PBMC), die mit SKMel63-Zellen inkubiert wurden.

Beispiel 1:

Genetische Konstruktion und Expression des einzelkettigen, bispezifischen Antikörper-Moleküls

Die monospezifischen scF_v-Antikörper wurden unter Verwendung des RPAS-Systems (Pharmacia Biotech, Freiburg) aus Hybridom-cDNA gewonnen. Die variablen Ketten V_L und V_H jeweils einer Spezifität sind miteinander durch einen flexiblen 15-Aminosäurelinker verbunden, der folgende Aminosäure-Sequenz aufweist:



Nach Herstellung der funktionellen monospezifischen scF_v-Fragmente wurden diese durch einen 19-Aminosäurenlinker verbun-

den. Dieser Linker L entspricht einem Teil des N-Terminus der C_H1-Domäne des humanen IgG. Die Aminosäuresequenz des Linkers L lautet wie folgt:

Ala-Ser-Thr-Lys-Gly-Pro-Ser-Val-Phe-Pro-Leu-Ala-Pro-Ser-Ser-Ser-Gly-Ser-Gly.

Auf diese Weise wurde ein Konstrukt generiert mit der folgenden 5'→3'-Orientierung:

$$(V_L-FL-V_H)_{9.3}-L-(V_H-FL-V_L)_{9.2.27}-6his.$$

V_L bezeichnet dabei jeweils die variable Domäne der leichten Kette, V_H die variable Domäne der schweren Kette. Das "9.3" Antikörper-Fragment ist spezifisch für CD28, das "9.2.27" Antikörper-Fragment für Melanom-assoziiertes Proteoglykan. Die Aminosäuresequenzen der Antikörper-Fragmente sind in Fig. 1b gezeigt. Der leichten Kette V_L 9.3 ist eine Leader-Sequenz vorgeschaltet zur Expression des Antikörper-Moleküls in den Kulturüberstand. "L" bezeichnet den Peptid-Linker, der die beiden Spezifitäten verbindet, "FL" stellt den 15 Aminosäure langen flexiblen Linker jeweils zwischen der schweren und der leichten Kette einer Spezifität dar. Mit "6his" ist ein Aminosäurerest mit sechs Histidinen angegeben, der auch als His-Tag bezeichnet wird.

Als regulatorische Elemente wurden zum einen an das 5'-Ende der kodierenden Region ein 1,1 kB κ-Promotorfragment fusioniert, am 3'-Ende ein 5,5 kB μ-Intron, das ein Enhancer-Fragment ("Enhancer") beinhaltet, und ein 1,8 kB langer PolyA-Schwanz ("PolyA") wurde angefügt (siehe Fig. 1a). Dieses Konstrukt wurde in einen

Vektor kloniert, der durch Fusion des pCDNA-3 (Stratagene, La Jolla, CA) und des pCR-Scriptvektors (Invitrogen, Groningen, The Netherlands) hergestellt wurde. Figur 1a zeigt schematisch die genetische Organisation des Antikörper-Moleküls (nicht maßstabsgetreu).

Anschließend wurden zwei Mausmyelomzelllinien, P3X63Ag8 und J558, durch Elektroporation mit dem Konstrukt transfiziert. Die Produktionsraten, die mit der J558-Zelllinie erreicht wurden, waren größer als die der anderen Zelllinien, weshalb diese für die Reinigung des rekombinanten Antikörpers verwendet wurde.

Statt der hier beschriebenen spontanen Dimerisierung des ersten bispezifischen Antikörper-Moleküls bei seiner rekombinanten Herstellung kann die Dimerisierung auch gezielt erfolgen. Es ist ferner möglich, durch rekombinante Technologie zweite erfindungsgemäße Antikörper-Moleküle herzustellen, die bivalent für CD28 und mono- oder bivalent für ein Tumor-Antigen sind und wie die Dimere aus den ersten erfindungsgemäßen Antikörper-Molekülen effektiv T-Zellen stimulieren.

Beispiel 2:

Reinigung des rekombinanten Antikörpers

In einem ersten Reinigungsschritt wurde der Ammoniumsulfat-gefällte Überstand transfizierter Zellen auf eine Protein-L-Säule gegeben. Protein-L bindet bestimmte V κ -Subtypen der leichten Ketten der Maus. Während der Gelfiltration konnten drei bestimmte Peaks identifiziert werden, die einem Molekulargewicht von ungefähr 55.000 (Peak 1), 100.000 (Peak 2) und 160.000 (Peak 3) Dalton entsprachen (siehe Fig. 2a). Die Gel-

filtration wurde auf Superdex S200 Säulen (Pharmacia, Freiburg, Deutschland) durchgeführt, entweder mit konventioneller FPLC-Ausrüstung für eine präparative Trennung, oder mit dem SMART System (Pharmacia) für eine analytische Gelfiltration.

Nach einer SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) hingegen konnten nur zwei Banden beobachtet werden, die einem Molekulargewicht von ungefähr 55.000 und 160.000 Dalton entsprachen, wie in Fig. 2b dargestellt: In Spur 6 ist der Ammoniumsulfat-gefällte Überstand transfizierter Zellen vor der Gelfiltration aufgetragen. In Spur 1 ist das Peak-1-Material nach Gelfiltration aufgetragen. In Spur 2 ist Peak-2-Material nach der Gelfiltration und nach Protein-G Adsorption gezeigt, in Spur 3 Peak-2-Material nach Gelfiltration und vor Protein-G Adsorption. Die Molekulargewichtsanalysen wurden durch eine 10% SDS-PAGE durchgeführt. Es wurde Protein-G und Protein-L Material der Firma Devitron (Castrop-Rauxel, Deutschland) verwendet.

In Anbetracht dessen, daß die 160 Kilodalton-schwere Bande durch die Adsorption an Protein-G entfernt werden konnte, konnte diese Bande als Immunglobulin identifiziert werden, das durch die transfizierte Zelllinie J558 selber produziert wurde.

Das gereinigte Material aus Peak 2 der Zelllinien J558 und P3X63Ag8 war von dem Peak-1-Material nach SDS-PAGE nicht zu unterscheiden: beide in den zwei Peaks enthaltenen Antikörperspezies, besaßen ein Molekulargewicht von ungefähr 58 Kilodalton, das in Übereinstimmung mit dem erwarteten Molekulargewicht des monomeren bispezifischen single-chain-Moleküls war.

Darüber hinaus erwiesen sich die beiden Antikörper-Spezies als identisch in der N-terminalen Proteinsequenzierung. Die Protein-Sequenz-Analysen wurden mittels eines Hewlett Packard Protein Sequenzer G241 (Hewlett Packard, Waldbronn, Germany) durch Edman-Abbau durchgeführt.

Zusammenfassend konnte also gezeigt werden, daß durch Gel-filtration eine Antikörper-Spezies mit einem Molekulargewicht von ungefähr 115 Kilodalton gereinigt werden konnte (Peak-2-Material) und daß dieser Antikörper in der SDS-PAGE mit genau der Hälfte des ursprünglichen Molekulargewichts erschien, daß er jedoch die gleichen Sequenzen wie das erwartete monomere bispezifischen single-chain-Molekül aufwies. Aufgrund dessen konnte gezeigt werden, daß das Peak-2-Material Homodimere der rekombinanten bispezifischen single-chain-Moleküle (rM28-Dimer) aufweist. Das Dimer ist durch SDS-PAGE nicht nachweisbar, da es bei der Gelelektrophorese in seine Monomere zerfällt.

Beispiel 3:

Bindungsaktivitäten der verschiedenen bispezifischen Antikörperspezies

Um die Bindung der bispezifischen Antikörper zu bestimmen, wurden Jurkat- und M21-Zellen, die CD28 und das Melanom-assoziierte Proteoglykan exprimieren, mit Antikörpern verschiedener Konzentrationen inkubiert, gewaschen und mit einem anti-Histidin monoklonalen Antikörper (dia 900, Dianova, Hamburg, Deutschland) und einem Ziegen- (anti-Maus) Antikörper (Dianova) gefärbt. Die Zellen wurden im FACSCalibur mit der CellQuest Software (Becton Dickinson, San Jose, USA) analysiert.

In Figur 3 ist die Bindungsaktivität der unterschiedlichen bispezifischen Antikörperspezies an Jurkat-Zellen dargestellt. Eine Bindung wurde sowohl für das Melanom-assoziierte Proteoglykan als auch für CD28 gemessen, beide Spezifitäten werden auf M21- und Jurkat-T-Zellen exprimiert. Wie aus Figur 3 zu erkennen ist, erwies sich das Bindungsverhalten des dimeren rekombinanten Antikörpers (◆ Dimer) als verbessert im Vergleich zu dem des monomeren single-chain-Antikörpers (■ Monomer).

Als Vergleich wurden außerdem chemisch hybridisierte bispezifische Antikörper (cm28) hergestellt: Antikörper, die entweder Melanom (9.2.27)-Spezifität oder CD28 (9.3)-Spezifität besaßen, wurden durch Protein A Säulenchromatographie aus Hybridomüberständen isoliert. Die Antikörper wurden fragmentiert und durch selektive Reduktion und Re-Oxidation von Disulfidbrücken der Hinge-Region hybridisiert. Das Verfahren zur chemischen Hybridisierung ist z.B. beschrieben von Jung et al.: "Target cell induced T cell activation with bi- and trispecific antibody fragments" Eur. J. Immunol. (1991) 21:2431-2435. Durch die verwendeten Reaktionsbedingungen konnte die Bildung von Homodimeren vermieden werden. Die so chemisch hybridisierten bispezifischen Antikörper zeigten in den Bindungsassays eine ähnliche Bindungsaffinität wie der monomere Antikörper (Daten nicht dargestellt).

Beispiel 4:

Targetzellinduzierte T-Zell-Aktivierung

Um Targetzell-induzierte T-Zell-Aktivierung zu messen, wurden sowohl die monomeren als auch die dimeren bispezifischen Tumor/CD28-Antikörper dreifach auf 96-well-Mikrotiterplatten mit

bestrahlten (120 Gy) SKMel63-Zellen (10^4 /well) und peripheren Blut-mononuklearen Zellen (im folgenden: PBMC) von gesunden Spendern (10^5 /well) inkubiert. Während der letzten 18 Stunden eines 4-tägigen Inkubationszeitraumes wurde ^3H -Thymidin hinzugefügt ($0,5 \mu\text{Ci/well}$). Die Zellen wurden geerntet und die Radioaktivität in einem Szintillationszähler (MicroBeta, Wallac) bestimmt.

In Fig. 4 ist die Induktion der T-Zell-Proliferation durch die unterschiedlichen bispezifischen Antikörperkonstrukte in Anwesenheit von SKMel63-Melanomzellen dargestellt, an die die Antikörper spezifisch binden: das chemisch hybridisierte F(ab')_2 -Fragment (\blacktriangle cM28) erwies sich selbst bei einer hohen Antikörperkonzentration als mäßig effektiv. Im Gegensatz dazu induzierten die rekombinanten dimeren Moleküle (\blacklozenge rM28-Dimer) eine Zellaktivierung, die vergleichbar zur Stimulierung mit Phythämagglutinin (PHA) ist, schon bei Konzentrationen von 10 ng/ml. Das Monomer (\blacksquare rM28-Monomer) zeigte eine bestimmte Aktivität bei hohen Konzentrationen, wobei diese Aktivität mit der Aufbewahrungszeit stieg. Die T-Zell-Aktivierung durch das rM28-Dimer in Abwesenheit von SKMel63-Targetzellen ist durch die Kurve mit dem Symbol \bullet gezeigt. Bei zwei von sechs unabhängigen Versuchen zeigte cM28 eine geringe Aktivität bei Konzentrationen von >300 ng/ml. Mit diesen Ausnahmen ist das in Fig. 4 dargestellte Experiment repräsentativ.

Wenn anfänglich monomeres Material nach einer Aufbewahrungszeit von zwei Wochen bei 4°C mittels Gelfiltration wieder analysiert wurde, zeigte sich, daß mehr als 15 % des Materials in dimerer Form vorlag. Deshalb kann zumindest ein Teil der Monomer-Aktivität auf die Tatsache zurückgeführt werden, daß geringe

Mengen an kontaminierendem Dimer entweder schon zu Beginn des Assays vorhanden waren oder aber erst spontan während des Verlaufs gebildet wurden.

In einigen Experimenten zeigte das dimere Molekül, nicht aber das monomere (rM28-Monomer) oder das bispezifische F(ab')₂-Fragment (cM28), eine gewisse Hintergrundaktivität, d.h. Induktion der T-Zell-Aktivierung ohne anwesende Targetzellen. Diese Aktivität war aber immer bedeutend niedriger als diejenige, die in Anwesenheit von Melanomzellen beobachtet wurde, und die Aktivität trat immer erst bei einer hohen Antikörperkonzentration auf. Wenn als Kontrolle UvGG eingesetzt wurde, eine Proteoglykan-negative "ovarian cancer" Karzinomzelllinie, erfolgte die T-Zell-Aktivierung nicht über diesen Hintergrundlevel hinaus.

Auch bei den antigennegativen Zellen T98G und U373 konnte keine über diesen Hintergrundlevel hinausgehende T-Zell-Aktivierung festgestellt werden.

Beispiel 5:

Abtötung von Tumorzellen

Zur Bestimmung der Abtötung von Tumorzellen wurden lebensfähige Melanomzellen dreifach in 96-well Mikrotiterplatten (5×10^3 /well) zusammen mit PBMC und Antikörpern inkubiert. Nach vier Tagen wurden die PBMC entfernt und die Anzahl der restlichen lebensfähigen, adhärierenden Tumorzellen nach Anfärbung mit dem Tetrazolium-Salz WST (Roche Diagnostics, Mannheim, Deutschland) bestimmt. Die optische Dichte wurde in einem ELISA-Reader (Spectra Max 340, Molecular devices, Sunnyvale,

CA) bestimmt und der Prozentsatz an abgetöteten Zellen berechnet.

Alternativ wurde die Cytotoxizität der PBMC nach Inkubation von lebensfähigen Tumor-Zellen in Kulturflaschen ($3 \times 10^4/\text{ml}$) mit PBMC ($6 \times 10^5/\text{ml}$) gemessen. Nach drei Tagen wurden die Zellen, die in Anwesenheit von SKW63-Zellen stimuliert wurden, geerntet und in einem ^{51}Cr -Freisetzungs-Assay getestet, mit stimulierenden SKW63-Zellen und M21-Zellen als Targets. Abschließend wurden beide Zelllinien mit ^{51}Cr ($40 \mu\text{Ci}/\text{ml}$) eine Stunde lang markiert, auf 96-well-Mikrotiterplatten ausgesät ($5 \times 10^3/\text{well}$) und mit PBMC's inkubiert, die in Anwesenheit von SKW63 und bispezifischen Antikörpern mit einem Effektor:Target-Verhältnis 30:1 stimuliert wurden. ^{51}Cr -Abgabe wurde nach vier Stunden gemessen. Der Prozentsatz an abgetöteten Tumor-Zellen wurde nach der folgenden Standard-Formel berechnet:

$$(\text{cpm}_x - \text{cpm}_{\text{spont}}) / (\text{cpm}_{\text{max}} - \text{cpm}_{\text{spont}})$$

Dabei bezeichnet cpm_{max} die Radioaktivität, die von mit Detergens behandelten Targetzellen freigesetzt wird, und $\text{cpm}_{\text{spont}}$ die spontane Freisetzung in Abwesenheit von PBMC und Antikörpern.

In Fig. 5 ist gezeigt, daß T-Zell-Aktivierung zu einer effektiven Abtötung von Tumorzellen führt. Nach vier Tagen wurden Melanomzellen, die mit PBMC in Anwesenheit des dimeren bispezifischen Antikörpers inkubiert wurden, beinahe vollständig abgetötet (◆ rM28-Dimer). Ähnlich wie beim Proliferationsassay war die Abtötung von Tumorzellen bedeutend verstärkt, wenn statt des monomeren (■ rM28-Monomer) der dimere (◆ rM28-Dimer) rekombinante bispezifische Antikörper verwendet wurde. Die Akti-

vität des chemisch hybridisierten bispezifischen Antikörpers (▲ cM28) war wiederum nur gering.

Fig. 6 zeigt die lytische Aktivität von PBMC, die für drei Tage mit SKMel63 inkubiert wurden, wobei die stimulierenden Zellen und die M21-Zellen in einem standardisierten ^{51}Cr -Abgabeassay als Target dienten. Es ist offensichtlich, daß der dimere rekombinante Antikörper bei der Induzierung der Zelllyse am effektivsten ist.

Trotzdem scheint diese Aktivität unspezifisch zu sein, da nicht nur die stimulierenden Zellen, sondern auch eine Melanomzelle mit unterschiedlichem HLA-Typ abgetötet wurde. Deshalb ist die lytische Aktivität, die unter diesen Bedingungen gemessen wurde, nicht auf alloreaktive T-Zellen zurückzuführen.

Zusammenfassend läßt sich also sagen, daß ein Dimer aus erfindungsgemäßen ersten bispezifischen Antikörper-Molekülen mit CD28/Tumor-Spezifität ein erfolgversprechendes Mittel ist, um T-Zellen bezüglich eines bestimmten Tumors effektiv zu aktivieren, ohne daß eine zusätzliche Stimulierung des TCR/CD3-Komplexes notwendig ist.

Es ist aber nicht zwingend erforderlich, daß das Antikörper-Molekül auch für das Tumor-Antigen bivalent ist, wichtig ist die Bivalenz für CD28.

Patentansprüche

1. Bispezifisches Antikörper-Molekül mit einer eine variable Domäne einer leichten Kette (V_L) und eine damit verbundene variable Domäne einer schwereren Kette (V_H) aufweisenden ersten Bindestelle für den T-Zell-Rezeptor CD28 und einer eine variable Domäne einer schweren Kette (V_H) und eine damit verbundene variable Domäne einer leichten Kette (V_L) aufweisenden Bindestelle für ein Tumor-Antigen, wobei die variablen Domänen der schweren Ketten miteinander durch einen Peptidlinker verbunden sind.
2. Bispezifisches Antikörper-Molekül nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß der Peptidlinker zumindest einen Teil des N-Terminus der C_H1 Domäne des menschlichen IgG aufweist.
3. Bispezifisches Antikörper-Molekül nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, daß an eine der leichten Ketten zumindest ein Teil eines *fos-jun*-Adaptors oder einer Hinge-Region fusioniert ist.
4. Bispezifisches Antikörper-Molekül mit Spezifität für den T-Zell-Rezeptor CD28 und mit Spezifität für ein Tumor-Antigen, wobei das bispezifische Antikörper-Molekül zumindest für CD28 bivalent ist.

5. Bispezifisches Antikörper-Molekül nach Anspruch 4, dadurch gekennzeichnet, daß an die beiden konstanten Domänen eines Fab-Fragments mit Anti-Tumor-Spezifität jeweils ein scFv-Fragment mit CD28-Spezifität fusioniert ist.
6. Bispezifisches Antikörper-Molekül nach Anspruch 4, dadurch gekennzeichnet, daß das bispezifische Antikörper-Molekül auch für das Tumor-Antigen bivalent ist.
7. Bispezifisches Antikörper-Molekül nach Anspruch 6, dadurch gekennzeichnet, daß es aus zwei bispezifischen Antikörper-Molekülen nach einem der Ansprüche 1 bis 3 besteht.
8. Bispezifisches Antikörper-Molekül nach Anspruch 6, dadurch gekennzeichnet, daß an die beiden schweren Ketten eines kompletten Antikörpers mit Anti-Tumor-Spezifität jeweils ein scFv-Fragment mit CD28-Spezifität fusioniert ist.
9. Bispezifisches Antikörper-Molekül nach einem der Ansprüche 1 bis 8, dadurch gekennzeichnet, daß das Tumor-Antigen ausgewählt ist aus der Gruppe umfassend Melanom-assoziiertes Proteoglykan, HER-2/neu oder CD20.
10. Nukleinsäure kodierend für ein bispezifisches Antikörper-Molekül nach einem der Ansprüche 1 bis 9.
11. Vektor enthaltend eine Nukleinsäure nach Anspruch 10.
12. Zelle enthaltend eine Nukleinsäure nach Anspruch 10 oder einen Vektor nach Anspruch 11.

13. Zelle nach Anspruch 12, dadurch gekennzeichnet, daß die Zelle aus der Gruppe umfassend Säugerzellen, Bakterienzellen, Insektenzellen, Pflanzenzellen und Hefezellen ausgewählt ist.
14. Verfahren zur Behandlung von Zellen, bei dem ein bispezifisches Antikörper-Molekül nach einem der Ansprüche 1 bis 9 eingesetzt wird, um eine supra-agonistische tumorzellinduzierte Aktivierung von T-Zellen zu bewirken, so daß keine zusätzlichen exogenen Stimuli benötigt werden.
15. Verfahren nach Anspruch 14, dadurch gekennzeichnet, daß Tumorzellen selektiv abgetötet werden, die das Tumor-Antigen exprimieren und zusammen mit T-Zellen und dem bispezifischen Antikörper-Molekül inkubiert werden.
16. Pharmazeutische Zusammensetzung mit einem bispezifischen Antikörper-Molekül nach einem der Ansprüche 1 bis 9 und einem pharmazeutisch akzeptierbaren Träger.
17. Verwendung eines bispezifischen Antikörper-Moleküls nach einem der Ansprüche 1 bis 9 zur tumorzellinduzierten T-Zell-Aktivierung.
18. Verwendung nach Anspruch 17 zur Therapie oder Prophylaxe von Tumorerkrankungen.

1 / 4

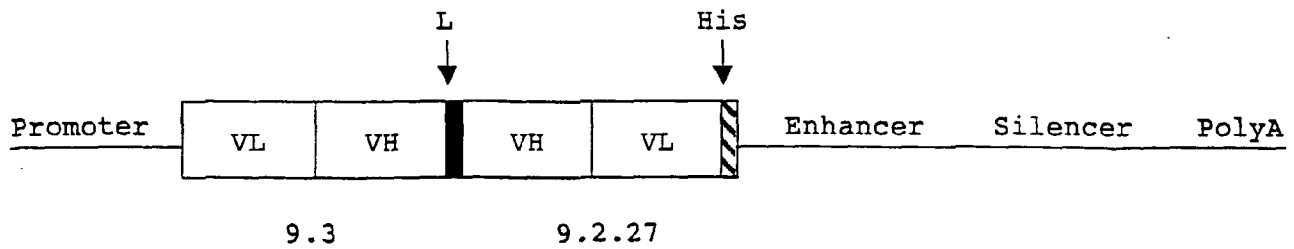


Fig. 1a

```

1   METDTLLLWV LLLWVPGSTG DIVLTQSPAS LAVSLGQRAT ISCRASESVE
51  YYVTSLMQWY QQKPGQPPKL LIFAASNVES GVPARFSGSG SGTNFSLNH
101 PVDEDDVAMY FCQQSRKVPI TFGGGTKLEI KRGGGSGGGG GSGGGGSQVK
151 LQQSGPGLVT PSQSLSITCT VSGFSLSDYG VHWVRQSPGQ GLEWLGVIWA
201 GGGTNYNSAL MSRKSISKDN SKSQVFLKMN SLQADDTAVY YCARDKGYSY
251 YYSMDYWGQG TTVTVSSAST KGPSVFPLAP SSSGSGQVKL QQSGPELVKP
301 GASVKISCKA SGYAFSRSWM NWVKQRPQGQ LEWIGRIYPG DGDNTYNGKF
351 KGKATLTADK SSSTAYMQVS SLTSVDSAVY FCARGNTVVV PYTMDYWGQG
401 TTVTVSSGGG GSGGGGSGGG GSDIELTQSP ASLAVSLGQR ATISCRASES
451 VDSYGNFSMH WYQQKPGQPP KLLIYLASNL ESGVPARFSG SGSRTDFTLT
501 IDPVEADDAA TYQCQNNED PLTFGGGTKL ELKRAAAHHH HHH**

```

```

21  - 132: VL 9.3
133 - 147: FL
148 - 267: VH 9.3
268 - 286: L
287 - 407: VH 9.2.27
408 - 422: FL
423 - 543: VL 9.2.27

```

Fig. 1b

2 / 4

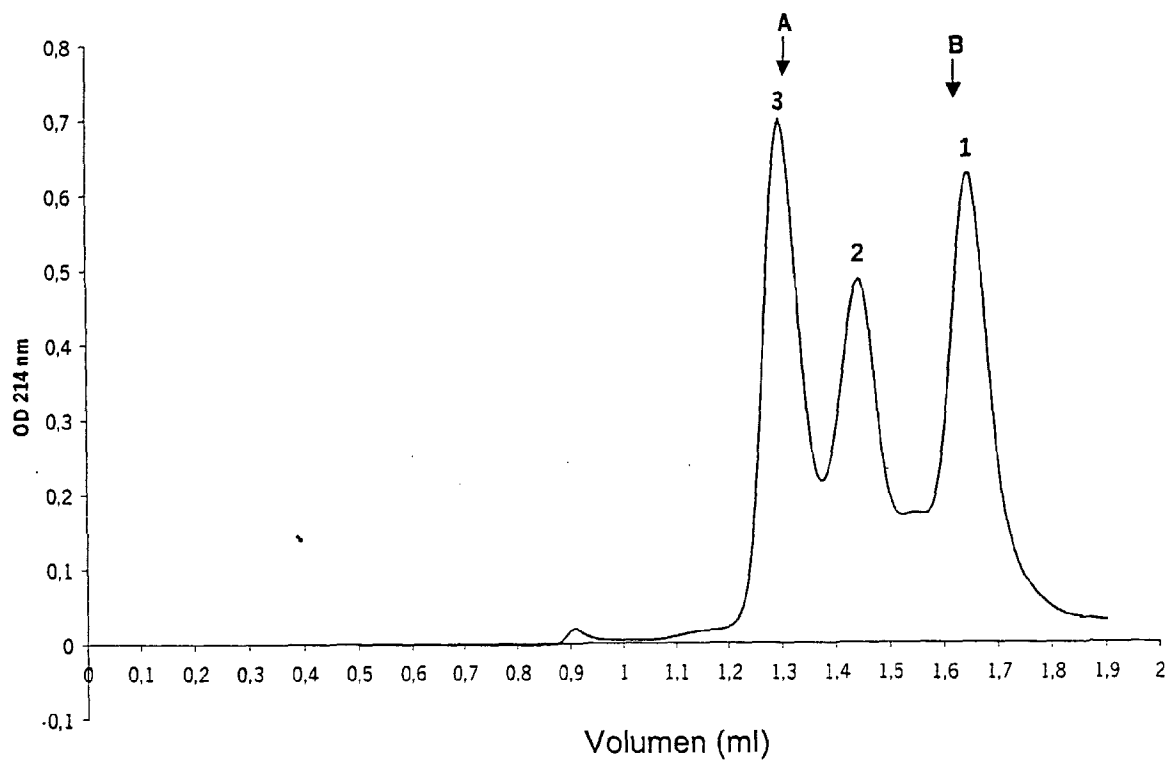


Fig. 2a

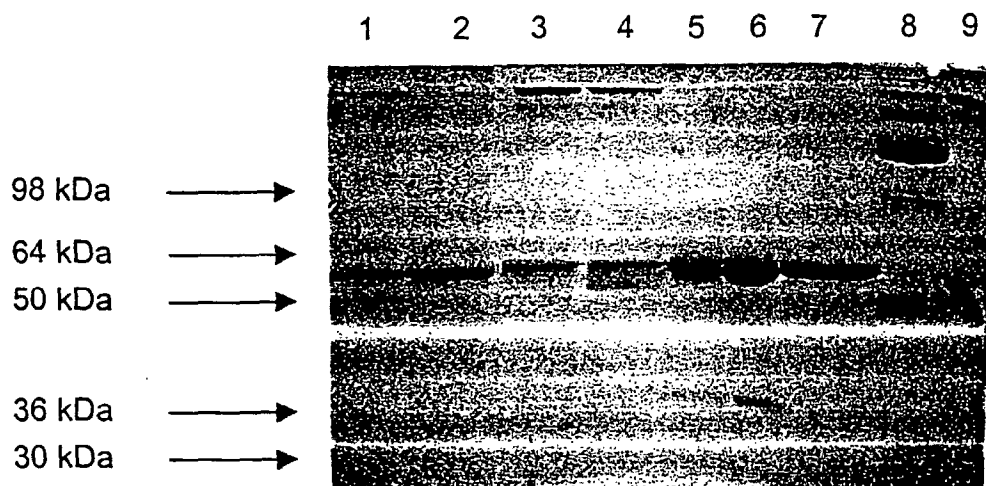


Fig. 2b

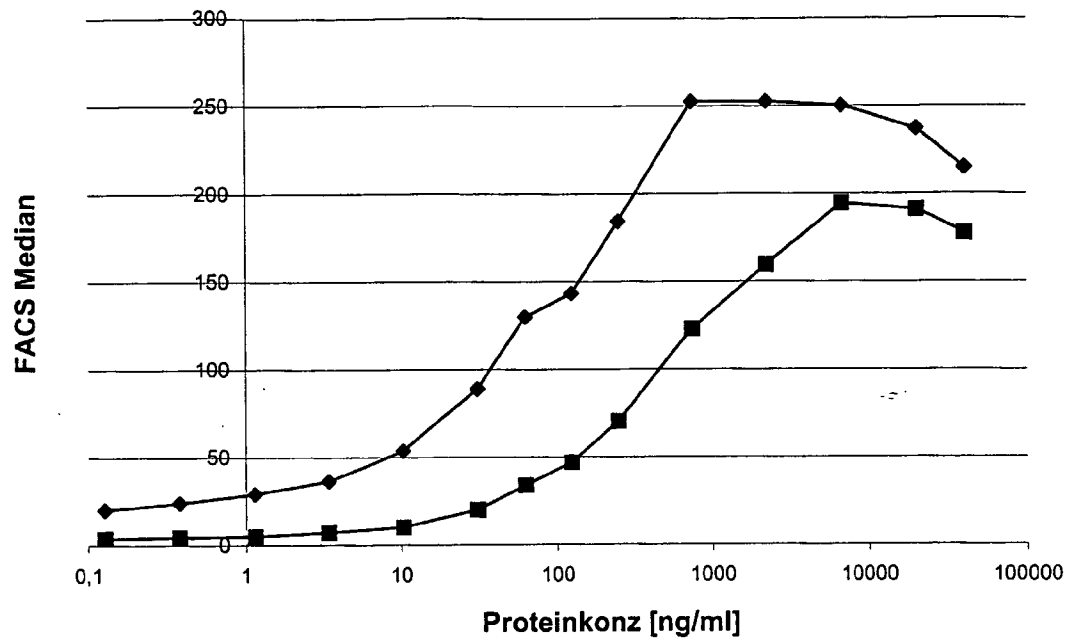


Fig. 3

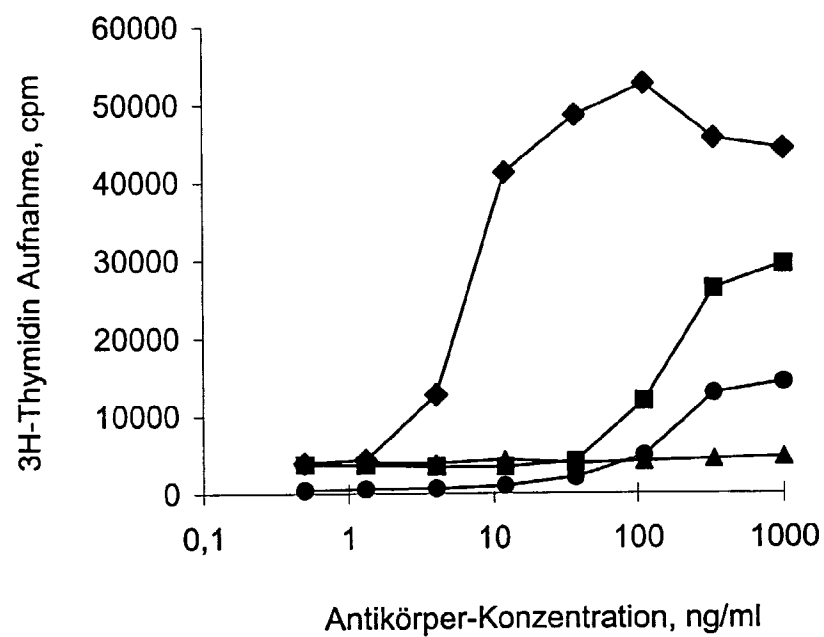


Fig. 4

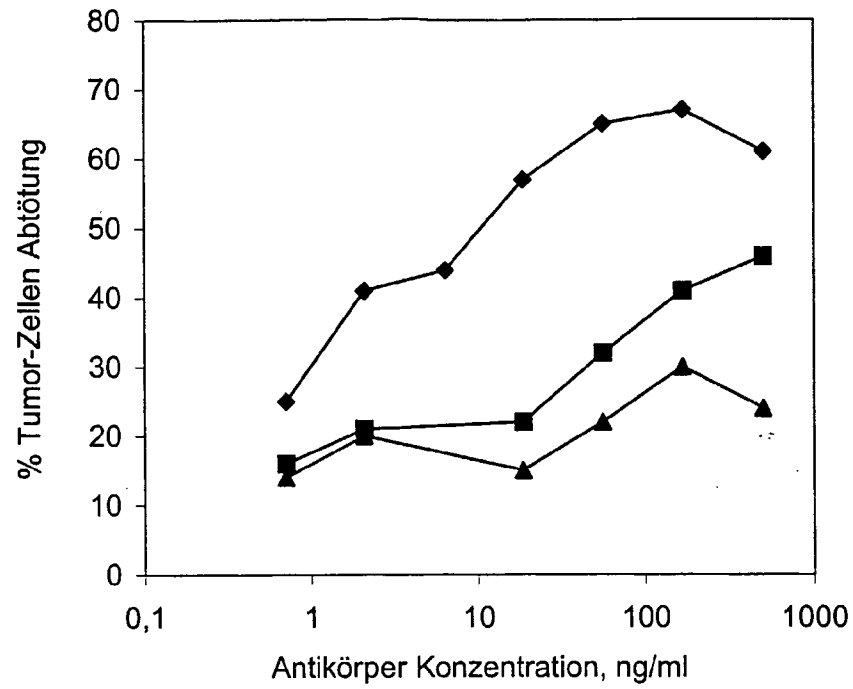


Fig. 5

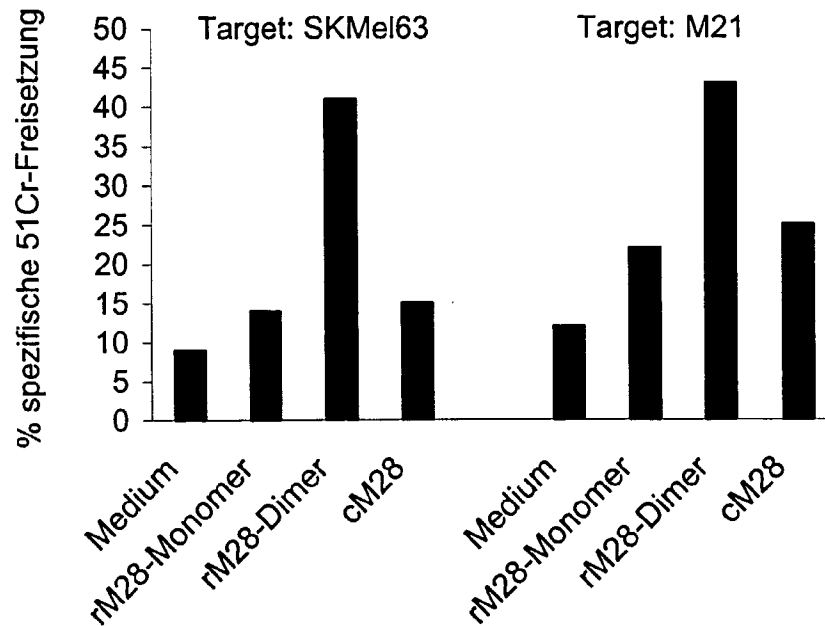


Fig. 6

(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES
PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum
22. Mai 2003 (22.05.2003)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer
WO 2003/042231 A3

(51) Internationale Patentklassifikation⁷: **C07K 16/46**,
16/28, 16/30

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP2002/012545

(22) Internationales Anmeldedatum:
9. November 2002 (09.11.2002)

(25) Einreichungssprache: Deutsch

(26) Veröffentlichungssprache: Deutsch

(30) Angaben zur Priorität:
101 56 482.1 12. November 2001 (12.11.2001) DE

CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE,
GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR,
KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK,
MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU,
SC, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA,
UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(84) Bestimmungsstaaten (*regional*): ARIPO-Patent (GH,
GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW),
eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ,
TM), europäisches Patent (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE,
DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT,
SE, SK, TR), OAPI-Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA,
GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Veröffentlicht:

— mit internationalem Recherchenbericht

(88) Veröffentlichungsdatum des internationalen
Recherchenberichts: 4. März 2004

*Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes und der anderen Ab-
kürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on Co-
des and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe der
PCT-Gazette verwiesen.*

(71) Anmelder und
(72) Erfinder: **JUNG, Gundram** [DE/DE]; Schwabstrasse 30,
72108 Rottenburg-Wendelsheim (DE).

(74) Anwalt: **VIERING, Hans-Martin**; Viering, Jentschura &
Partner, P.O. Box 221443, 80504 München (DE).

(81) Bestimmungsstaaten (*national*): AE, AG, AL, AM, AT,
AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR,

(54) Title: BISPECIFIC ANTI-CD28 ANTIBODY MOLECULE

(54) Bezeichnung: BISPEZIFISCHES ANTI-CD28-ANTIKÖRPER-MOLEKÜL

(57) **Abstract:** A first bispecific antibody molecule comprises at least one binding site with a variable domain on a light chain (V_L) and a variable domain for the T-cell receptor CD-28, linked thereto on a heavy chain (V_H). The antibody molecule further comprises at least one binding site with a variable domain on a heavy chain (V_H) and a variable domain for a tumour antigen, linked thereto on a light chain (V_L). The variable domains on the heavy chains for both specificities are connected to each other by means of a peptide linker. A second bispecific antibody molecule is bivalent for CD-28 and at least monovalent for the tumour antigen.

(57) **Zusammenfassung:** Ein erstes bispezifisches Antikörper-Molekül weist zumindest eine Bindestelle mit einer variablen Domäne einer leichten Kette (V_L) und eine damit verbundene variable Domäne einer schweren Kette (V_H) für den T-Zell-Rezeptor CD28 auf. Das Antikörper-Molekül weist ausserdem zumindest eine Bindestelle mit einer variablen Domäne einer schweren Kette (V_H) und eine damit verbundene variable Domäne einer leichten Kette (V_L) für einen Tumor-Antigen auf. Die variablen Domänen der schweren Ketten der beiden Spezifitäten sind miteinander durch einen Peptidlinker verbunden. Ein zweites bispezifisches Antikörper-Molekül ist bivalent für CD28 und zumindest monovalent für den Tumor-Antigen.

WO 2003/042231 A3

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/EP 02/12545

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 7 C07K16/46 C07K16/28 C07K16/30

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 7 C07K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

EPO-Internal, BIOSIS, EMBL, WPI Data, PAJ, EMBASE, MEDLINE, SEQUENCE SEARCH, CHEM ABS Data

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 97 47271 A (GUO YAJUN) 18 December 1997 (1997-12-18) page 17, line 13 - line 25 page 31 -page 34	4,6, 10-18
Y	EP 0 440 373 A (SQUIBB BRISTOL MYERS CO) 7 August 1991 (1991-08-07) abstract	4-6,8-13
	-/--	

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.

☒ Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents:

A document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

E earlier document but published on or after the international filing date

L document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

O document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

P document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

I later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

X document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

Y document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

& document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

8 August 2003

Date of mailing of the international search report

22/08/2003

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Irion, A

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/EP 02/12545

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	<p>SCHOONJANS R ET AL: "Fab chains as an efficient heterodimerization scaffold for the production of recombinant bispecific and trispecific antibody derivatives" JOURNAL OF IMMUNOLOGY, WILLIAMS & WILKINS CO, US, vol. 165, no. 12, 15 December 2000 (2000-12-15), pages 7050-7057, XP002207879 ISSN: 0022-1767 cited in the application abstract page 7051, left-hand column, paragraph 3 page 7052; figure 1</p>	4-6,8-13
A	<p>WO 94 13806 A (DOW CHEMICAL CO) 23 June 1994 (1994-06-23) figure 1 page 4, line 7 - line 8 page 5, line 14 -page 6, line 3</p>	1-3
A	<p>BODE C ET AL: "ANTIBODY-DIRECTED FIBRINOLYSIS AN ANTIBODY SPECIFIC FOR BOTH FIBRIN AND TISSUE PLASMINOGEN ACTIVATOR" JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, vol. 264, no. 2, 1989, pages 944-948, XP001154126 ISSN: 0021-9258 the whole document</p>	4,6
P,X	<p>DATABASE EMBL 'Online! ACCESSION NO: AJ507107, 2 September 2002 (2002-09-02) GROSSE-HOVEST L.: "Synthetic construct for anti-CD28 and anti-HMWG scFv antibody, clone r28M" XP002250207 abstract</p>	1-18
T	<p>GROSSE-HOVEST LUDGER ET AL: "A recombinant bispecific single-chain antibody induces targeted, supra-agonistic CD28- stimulation and tumor cell killing." EUROPEAN JOURNAL OF IMMUNOLOGY, vol. 33, no. 5, 20 May 2003 (2003-05-20), pages 1334-1340, XP002250206 ISSN: 0014-2980</p>	1-18

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/EP 02/12545

Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☒ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

Although Claims 14, 15, 17 and 18 relate to a method for treatment of the human or animal body, the search was carried out on the basis of the alleged effects of the compound or composition.
2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/EP 02/12545

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9747271	A	18-12-1997	AU 727955 B2	04-01-2001
			AU 4228397 A	07-01-1998
			CA 2258082 A1	18-12-1997
			CN 1221349 A	30-06-1999
			EP 0956046 A2	17-11-1999
			JP 11514666 T	14-12-1999
			WO 9747271 A2	18-12-1997
			US 2002102278 A1	01-08-2002
EP 0440373	A	07-08-1991	AT 152170 T	15-05-1997
			CA 2034769 A1	26-07-1991
			DE 69125735 D1	28-05-1997
			DE 69125735 T2	04-09-1997
			DK 440373 T3	30-06-1997
			EP 0440373 A1	07-08-1991
			ES 2101715 T3	16-07-1997
			GR 3023723 T3	30-09-1997
			HU 56723 A2	28-10-1991
			IL 97023 A	18-03-1997
			ZA 9100463 A	30-09-1992
WO 9413806	A	23-06-1994	AT 187494 T	15-12-1999
			AU 680461 B2	31-07-1997
			AU 5747794 A	04-07-1994
			CA 2117477 A1	23-06-1994
			DE 69327229 D1	13-01-2000
			DE 69327229 T2	30-03-2000
			EP 0628078 A1	14-12-1994
			HK 1019014 A1	18-08-2000
			JP 7503622 T	20-04-1995
			JP 3312357 B2	05-08-2002
			SG 55079 A1	21-12-1998
			WO 9413806 A1	23-06-1994
			US 5877291 A	02-03-1999
			US 5892020 A	06-04-1999

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES

IPK 7 C07K16/46 C07K16/28 C07K16/30

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierter Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)

IPK 7 C07K

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

EPO-Internal, BIOSIS, EMBL, WPI Data, PAJ, EMBASE, MEDLINE, SEQUENCE SEARCH, CHEM ABS Data

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	WO 97 47271 A (GUO YAJUN) 18. Dezember 1997 (1997-12-18) Seite 17, Zeile 13 - Zeile 25 Seite 31 -Seite 34	4,6, 10-18
Y	EP 0 440 373 A (SQUIBB BRISTOL MYERS CO) 7. August 1991 (1991-08-07) Zusammenfassung	4-6,8-13



Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen



Siehe Anhang Patentfamilie

* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

A Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

E älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

L Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

O Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

P Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

T Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

X Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden

Y Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

& Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

8. August 2003

Absenddatum des internationalen Recherchenberichts

22/08/2003

Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde

Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel.: (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Irion, A

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie°	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
Y	<p>SCHOONJANS R ET AL: "Fab chains as an efficient heterodimerization scaffold for the production of recombinant bispecific and trispecific antibody derivatives"</p> <p>JOURNAL OF IMMUNOLOGY, WILLIAMS & WILKINS CO, US, Bd. 165, Nr. 12, 15. Dezember 2000 (2000-12-15), Seiten 7050-7057, XP002207879 ISSN: 0022-1767 in der Anmeldung erwähnt Zusammenfassung Seite 7051, linke Spalte, Absatz 3 Seite 7052; Abbildung 1</p>	4-6,8-13
A	<p>WO 94 13806 A (DOW CHEMICAL CO) 23. Juni 1994 (1994-06-23) Abbildung 1 Seite 4, Zeile 7 - Zeile 8 Seite 5, Zeile 14 -Seite 6, Zeile 3</p>	1-3
A	<p>BODE C ET AL: "ANTIBODY-DIRECTED FIBRINOLYSIS AN ANTIBODY SPECIFIC FOR BOTH FIBRIN AND TISSUE PLASMINOGEN ACTIVATOR"</p> <p>JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, Bd. 264, Nr. 2, 1989, Seiten 944-948, XP001154126 ISSN: 0021-9258 das ganze Dokument</p>	4,6
P,X	<p>DATABASE EMBL 'Online! ACCESSION NO: AJ507107, 2. September 2002 (2002-09-02) GROSSE-HOVEST L.: "Synthetic construct for anti-CD28 and anti-HMWG scFv antibody, clone r28M" XP002250207 Zusammenfassung</p>	1-18
T	<p>GROSSE-HOVEST LUDGER ET AL: "A recombinant bispecific single-chain antibody induces targeted, supra-agonistic CD28- stimulation and tumor cell killing."</p> <p>EUROPEAN JOURNAL OF IMMUNOLOGY, Bd. 33, Nr. 5, 20. Mai 2003 (2003-05-20), Seiten 1334-1340, XP002250206 ISSN: 0014-2980</p>	1-18

Feld I Bemerkungen zu den Ansprüchen, die sich als nicht recherchierbar erwiesen haben (Fortsetzung von Punkt 2 auf Blatt 1)

Gemäß Artikel 17(2)a) wurde aus folgenden Gründen für bestimmte Ansprüche kein Recherchenbericht erstellt:

1. ☒ Ansprüche Nr.
weil sie sich auf Gegenstände beziehen, zu deren Recherche die Behörde nicht verpflichtet ist, nämlich

Obwohl die Ansprüche 14,15,17 und 18 sich auf ein Verfahren zur Behandlung des menschlichen/tierischen Körpers beziehen, wurde die Recherche durchgeführt und gründete sich auf die angeführten Wirkungen der Verbindung/Zusammensetzung.
2. ☐ Ansprüche Nr.
weil sie sich auf Teile der internationalen Anmeldung beziehen, die den vorgeschriebenen Anforderungen so wenig entsprechen, daß eine sinnvolle internationale Recherche nicht durchgeführt werden kann, nämlich
3. ☐ Ansprüche Nr.
weil es sich dabei um abhängige Ansprüche handelt, die nicht entsprechend Satz 2 und 3 der Regel 6.4 a) abgefaßt sind.

Feld II Bemerkungen bei mangelnder Einheitlichkeit der Erfindung (Fortsetzung von Punkt 3 auf Blatt 1)

Die internationale Recherchenbehörde hat festgestellt, daß diese internationale Anmeldung mehrere Erfindungen enthält:

1. ☐ Da der Anmelder alle erforderlichen zusätzlichen Recherchegebühren rechtzeitig entrichtet hat, erstreckt sich dieser internationale Recherchenbericht auf alle recherchierbaren Ansprüche.
2. ☐ Da für alle recherchierbaren Ansprüche die Recherche ohne einen Arbeitsaufwand durchgeführt werden konnte, der eine zusätzliche Recherchegebühr gerechtfertigt hätte, hat die Behörde nicht zur Zahlung einer solchen Gebühr aufgefordert.
3. ☐ Da der Anmelder nur einige der erforderlichen zusätzlichen Recherchegebühren rechtzeitig entrichtet hat, erstreckt sich dieser internationale Recherchenbericht nur auf die Ansprüche, für die Gebühren entrichtet worden sind, nämlich auf die Ansprüche Nr.
4. ☐ Der Anmelder hat die erforderlichen zusätzlichen Recherchegebühren nicht rechtzeitig entrichtet. Der internationale Recherchenbericht beschränkt sich daher auf die in den Ansprüchen zuerst erwähnte Erfindung; diese ist in folgenden Ansprüchen erfaßt:

Bemerkungen hinsichtlich eines Widerspruchs☐ Die zusätzlichen Gebühren wurden vom Anmelder unter Widerspruch gezahlt.☐ Die Zahlung zusätzlicher Recherchegebühren erfolgte ohne Widerspruch.

INTERNATIONAL RESEARCH REPORT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 02/12545

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
WO 9747271 A	18-12-1997	AU 727955 B2	04-01-2001
		AU 4228397 A	07-01-1998
		CA 2258082 A1	18-12-1997
		CN 1221349 A	30-06-1999
		EP 0956046 A2	17-11-1999
		JP 11514666 T	14-12-1999
		WO 9747271 A2	18-12-1997
		US 2002102278 A1	01-08-2002
EP 0440373 A	07-08-1991	AT 152170 T	15-05-1997
		CA 2034769 A1	26-07-1991
		DE 69125735 D1	28-05-1997
		DE 69125735 T2	04-09-1997
		DK 440373 T3	30-06-1997
		EP 0440373 A1	07-08-1991
		ES 2101715 T3	16-07-1997
		GR 3023723 T3	30-09-1997
		HU 56723 A2	28-10-1991
		IL 97023 A	18-03-1997
		ZA 9100463 A	30-09-1992
WO 9413806 A	23-06-1994	AT 187494 T	15-12-1999
		AU 680461 B2	31-07-1997
		AU 5747794 A	04-07-1994
		CA 2117477 A1	23-06-1994
		DE 69327229 D1	13-01-2000
		DE 69327229 T2	30-03-2000
		EP 0628078 A1	14-12-1994
		HK 1019014 A1	18-08-2000
		JP 7503622 T	20-04-1995
		JP 3312357 B2	05-08-2002
		SG 55079 A1	21-12-1998
		WO 9413806 A1	23-06-1994
		US 5877291 A	02-03-1999
		US 5892020 A	06-04-1999